

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/003220

International filing date: 26 March 2005 (26.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 102004016653.6
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 22 July 2005 (22.07.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

08. 07. 2005

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 016 653.6

Anmeldetag: 31. März 2004

Anmelder/Inhaber: BASF Plant Science GmbH, 67056 Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Verwendung von hydroxypropylierter hochamylose-
haltiger Kartoffelstärke zur Erzielung hoher KIT-Zah-
len

IPC: B 65 D 65/42

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 29. Juni 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

Patentansprüche

1. Mehrschichtige Verpackung für fettende Güter oder Teil einer solchen Verpackung, umfassend
- 5
- eine Trägerschicht aus einem polymeren Material als Hauptkomponente und
 - mindestens eine auf die Trägerschicht aufgebrachte, nicht die Außenseite der Verpackung bildende Schicht, die ein Hochamylose-Stärkederivat mit einem Amylosegehalt von mindestens 70% als Hauptkomponente enthält, dadurch gekennzeichnet, dass das Hochamylose-Stärkederivat ein mit einem C₂-C₆-Alkylenoxid modifiziertes Stärkederivat ist.
- 10
2. Mehrschichtige Verpackung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Hochamylose-Stärkederivat ein mit einem C₂-C₄-Alkylenoxid modifiziertes Stärkederivat ist.
- 15
3. Mehrschichtige Verpackung oder Teil einer solchen Verpackung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das C₂-C₆-Alkylenoxid Propylenoxid ist.
- 20
4. Mehrschichtige Verpackung oder Teil einer solchen Verpackung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Hochamylose-Stärkederivat durch Modifizierung ggf. teilabgebauter Mais-, Weizen-, Kartoffel-, HA Erbsen- oder Tapiokastärke erhalten wird.
- 25
5. Mehrschichtige Verpackung oder Teil einer solchen Verpackung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Derivatisierungsgrad des Stärkederivats 0,1 bis 1, stärker bevorzugt 0,1 bis 0,4 beträgt.
- 30
6. Mehrschichtige Verpackung oder Teil einer solchen Verpackung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das polymere Material der Trägerschicht ein natürlich vorkommendes Polymer, vorzugsweise Cellulose, ist.
- 35
7. Mehrschichtige Verpackung oder Teil einer solchen Verpackung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die ein Hochamylose-Stärkederivat als Hauptkomponente enthaltende Schicht zusätzliche Bestandteile, ausgewählt unter Pigmenten, Weichmachern, die Langzeitstabilität erhöhenden Mitteln, die Wasserstabilität erhöhenden Mitteln und die Elastizität beeinflussenden Mitteln, enthält.
- 40

2

- 5 8. Verwendung einer mit einem C₂-C₆-Alkylenoxid derivatisierten Hochamylose-Stärke als Hauptkomponente einer Schicht einer mehrschichtigen Verpackung, die auf einer Trägerschicht dieser Verpackung aus einem polymeren Material aufgebracht ist, zur Erzeugung von Fettdichtigkeit der mehrschichtigen Verpackung.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das C₂-C₆-Alkylenoxid Propylenoxid ist .
- 10 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Stärkederivat durch Modifizierung von Hochamylose-Kartoffelstärke erhalten wird und ggf. einen Derivatisierungsgrad von 0,1 bis 1, stärker bevorzugt von 0,1 bis 0,4 aufweist.
- 15 11. Verwendung nach einem der Ansprüche 8, 9 oder 10 dadurch gekennzeichnet, dass zur Modifizierung eine Hochamylose-Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von mindestens 70 % verwendet wird.
- 20 12. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die genannte Schicht zusätzliche Bestandteile, ausgewählt unter Pigmenten, Weichmachern, die Langzeitstabilität erhöhenden Mitteln, die Wasserstabilität erhöhenden Mitteln, den KIT-Wert erhöhenden Mitteln und die Elastizität beeinflussenden Mitteln, bevorzugt ausgewählt unter Glycerin, Harnstoff, Borax oder Glyoxal, enthält.
- 25

Verwendung von hydroxypropylierter hochamylosehaltiger Kartoffelstärke zur Erzielung hoher KIT-Zahlen

Beschreibung

5

Gegenstand der Erfindung sind mehrschichtige, fettdichte Verpackungsmaterialien mit einer Trägerschicht, die aus Papier/Karton oder anderen geeigneten, auf Polymeren basierenden Stoffen bestehen.

10

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von fettdichtem Verpackungsmaterial mit einer KIT-Zahl von größer 21 durch Verwendung von hydroxypropylierter hochamylosehaltiger Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von größer 70 %.

15

Es ist seit langem bekannt, Papier- und Kartonbehälter mit Beschichtungen zu versehen, die eine Sperrwirkung für Aromen oder Feuchtigkeit/Flüssigkeiten besitzen. So beschreibt die Patentanmeldung DE 41 09 983 A 1 ein flexibles Verpackungsbehältnis mit einem Verbund aus einer Papierschicht und einer thermoplastischen Schicht oder Folie. Das thermoplastische Schicht- oder Folienmaterial besteht aus Stärke, einem synthetischen, nicht- polyolefinischen, hydroxylgruppenhaltigen Polymeren, z.B. einem oxygenierten Polymeren, sowie Weichmachern natürlichen Ursprungs, z.B. stärkeabgeleiteten Polyalkoholen. Dieses Material kann durch Wärmezufuhr aufgeschmolzen werden und ist daher extrudierbar. In der Patentanmeldung DE 41 37 802 A1 wird vorgeschlagen, einen Karton mit einer beschichteten Papierbahn zu kaschieren, um ein verrottbares, flüssigkeitsabweisendes Produkt zu erhalten. Die Beschichtung der Papierbahn soll auf Stärkebasis erfolgen. Die Patentanmeldung DE 42 94 110 offenbart eine Beschichtungsdispersion, die aus Copolymerisaten von oxidierte Stärke und Styrol, Butadien, Acrylsäure oder ähnlichen polymerisierbaren Molekülen erzeugt wird. Diese Dispersion vermindert die Gas- und Wasserdurchlässigkeit von Karton oder Papier.

20

25

30

35

Allerdings ist es häufig notwendig, Verpackungsmaterialien mit hoher Fettdichtigkeit bereitzustellen. So fordern Tiernahrung, Backwaren, Konfekt und Schokolade von der Verpackung eine besonders hohe Fettdichtigkeit, die beispielsweise durch die KIT-Zahlen mit Werten zwischen 8 und 12 angegeben werden. Hohe KIT-Zahlen stehen dabei für hohe Fettdichtigkeiten.

40

Entsprechende im Handel angebotene Papier-/Kartonverpackungen sind üblicherweise einer fettabweisenden Oberflächen- und/oder Massebehandlung unterzogen worden. Für diese Massebehandlung bzw. Oberflächenbehandlung werden derzeit vor allem Fluorpolymere eingesetzt, wobei etwa bis zu 5 Gew.-% Beschichtungsmaterial auf das Material gelangen. Bereits Fettdichten > 6 bis 8 können nur durch Kombinationen von

Schicht- und Massebehandlung erreicht werden, Fettdichten mit KIT-Zahlen > 12 können mit den gegenwärtigen Systemen nicht garantiert werden. Beispielsweise erfordert das Verpacken von trockenem Tierfutter mit niedrigem Fettgehalt (<10 %) eine Behandlung der Rückseite in der Masse, bei höheren Fettgehalten wird eine Barriere durch Massebehandlung in Kombination mit einer Oberflächenbeschichtung durchgeführt.

Papier-, Papp- und Kartonverpackungen werden ordnungsgemäß über den Altpapierkreislauf entsorgt. Die als Fettbarriere eingesetzten Halogenpolymere gelangen somit über die Papieraufbereitung entweder in die Papierneuware oder in das Prozessabwasser.

Stärkeether sind als Hilfsstoffe und Einsatzstoffe in der Papierindustrie bekannt. Dabei genutzte Eigenschaften sind in der einschlägigen Literatur ausführlich beschrieben. Sie werden eingesetzt in der Oberflächenbeschichtung bzw. dem Strich sowie in pigmentierten Papierbeschichtungen. Auch für den Lebensmittelkontakt zugelassene Papiere, Kartons und Pappen dürfen nach dem BGVV Stärkeether (z.B. Hydroxyethyl- und Hydroxypropylether) enthalten. Stärkeether werden wegen ihrer guten Filmbildungseigenschaft und ihrem Wasserbindevermögen außerdem als Bestandteil von Klebstoffen verwendet. Literatur hierzu findet sich beispielsweise in Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie; W. Baumann/B. Herberg: Papierchemikalien - Fakten zum Umweltschutz (Springer-Verlag); O.B: Würzburg:

Modified Starches: Properties and Uses (CRC Press).

WO 02/02412 beschreibt mehrschichtige Verpackungen für fettende Güter basierend auf nativer, modifizierter Stärke.

Weiterhin ist bekannt, dass Stärkeether-Derivate zu Folien bzw. Filmen verarbeitet werden können, vornehmlich in Gießtechnik aus einer wässrigen Lösung.

Wenn die Herstellung der Stärkeether nach dem Slurry-Verfahren erfolgt, wird die wässrige Stärkesuspension im Alkalischen bei Temperaturen bis zu 50°C derivatisiert. Der Derivatisierungsgrad liegt dabei meist um 0,2. Charakteristisch für diese Verfahren ist die bevorzugte Derivatisierung am C2-Atom. Ein anderes, vornehmlich aus wissenschaftlichen Untersuchungen bekanntes Verfahren (Autoklav-Verfahren) geht von alkalisch aktivierter Stärke aus und kommt bei geringeren Trockensubstanz-Konzentrationen zu homogenen Derivatisierungen, wobei der Derivatisierungsgrad allerdings ähnlich eingestellt wird. Ein Vorgehen nach dieser Strategie ist in der Patentanmeldung DE 42 23 471 A1 beschrieben, wobei die so erhaltenen Stärkeether zur Folienherstellung eingesetzt werden sollen, und zwar insbesondere für die Anwendung als Overhead-, Kopier- und Druckerfolien oder für die Oberflächenveredlung von Spezialpapie-

ren sowie als Verpackungsmaterial. Darüber hinaus wird in dieser Druckschrift erwähnt, dass die genannten Etherderivat-Folien auch im Verbund mit anderen Materialien verwendet werden können.

- 5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von lebensmittelrechtlich zulässigen, fettdichten Verpackungsmaterialien mit sehr hoher KIT-Zahl.

- 10 Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass Substrate, die selbst keine ausreichende Fettbeständigkeit aufweisen, wie Papier, Karton, Pappe oder andere aus oder mit Cellulose hergestellte Materialien, dann fettdicht sind, wenn sie mit alkylendioxyderivatisierter Stärke mit einem Amylosegehalt von größer 70% beschichtet sind.

- 15 Die vorliegende Erfindung stellt daher mehrschichtige Verpackungen für fettende Güter oder Teile solcher Verpackungen bereit, die eine Trägerschicht aus einem polymeren Material als Hauptkomponente sowie mindestens eine auf die Trägerschicht aufgebraachte, nicht die Außenseite der Verpackung bildende Schicht aufweisen, wobei die auf die Trägerschicht aufgebraachte Schicht eine alkylendioxyderivatisierte Stärke mit einem Amylosegehalt von größer 70% als Hauptkomponente enthält. Das hierfür verwendete Alkylendioxy kann in gut geeigneter Weise ein C₂-C₆-Alkylendioxy sein. C₂-C₄-Alkylendioxye sind bevorzugt.

- 25 Die Beschichtung eines Trägermaterials mit der Funktionsschicht "Hochamylose(HA)-Stärkederivat" realisiert ein fettdichtes Verbundsystem. Die HA-Stärkekomponente ist dabei verantwortlich für die Fettdichtigkeit und weist zudem die Eigenschaft der biologischen Abbaubarkeit auf. Außerdem lässt sich eine solche Stärke gut in Beschichtungsmassen für den angegebenen Zweck einarbeiten, da sie - im Gegensatz zu nativer Stärke - nicht zum Re-Aggregieren (Retrogradation) neigt.

- 30 Die Verpackungen der vorliegenden Erfindung sind nicht auf spezifische Ausgestaltungen beschränkt. Ein beispielhafter, bevorzugter Anwendungsbereich sind Verpackungen von Lebens- und Tierfuttermitteln mit geringen Wassergehalten und gleichzeitig hohen Fettgehalten, insbesondere Faltschachteln. Beispiele hierfür sind Verpackungen für Kekse, Schokoladen, sonstige Süßwaren, trockenes Tierfutter, bei denen eine besonders gute Barriere gegen den Durchtritt von Wasserdampf nicht erforderlich ist.
- 35 Aber auch Verpackungen für fetthaltige Nicht-Lebensmittel (z.B. Kosmetika, ölhaltige Farbpigmente oder dergleichen) können erfindungsgemäß gestaltet werden.

- 40 Weitere Anwendungsmöglichkeiten liegen in der Beschichtung von anderen Polymeren als Cellulose mit dem erfindungsgemäß vorgeschlagenen Material (z.B. andere Verpackungsmaterialien) für ähnliche Verpackungsaufgaben. Auch die Beschichtung von Papier im Sinne eines Einschlagpapiers ist eine mögliche Anwendung.

Mit den Verpackungsmaterialien der vorliegenden Erfindung lassen sich hohe Fettdichtigkeiten erzielen, die im Bereich ab einer KIT-Zahl von 10, vorzugsweise von mindestens 17, in der Regel aber wesentlich höher liegen. So können Dichtigkeiten einer KIT-Zahl von über 21 erreicht werden, die mit den bisherigen, nicht biokompatiblen bzw. -
5 abbaubaren Systemen nicht garantiert werden können.

Weitere Vorteile der erfindungsgemäßen Verpackungen sind, dass ihre Herstellung mit üblichen Verfahren der Papier- bzw. Kartonherstellung kompatibel ist und dass sie biologisch abbaubar sind, wobei sie hinsichtlich der ökonomischen und/oder ökologischen
10 Bewertungen im Vergleich zu üblichen Systemen als besonders vorteilhaft einzustufen sind, insbesondere wenn die Faktoren Preis der Beschichtung einschließlich Verfahrenskosten und die Verträglichkeit mit dem Papierrecyclingprozess berücksichtigt werden sollen.

15 Aufgrund ihrer Bioabbaubarkeit gewährleisten die erfindungsgemäß beschichteten Verpackungen eine gute Verträglichkeit mit den Aufbereitungs- und Abwasserreinigungsmöglichkeiten von Altpapierentsorgungsanlagen. Hier stellt das Abbauverhalten im Papierkreislauf im Sinne der Vermeidung eines weiteren Störstoffeintrags einen entscheidenden Vorteil dar. Geeignete Materialien für die Trägerschicht sind insbesondere
20 Papier, Pappe oder Karton, ggf. in Mischung mit anderen geeigneten oder in der Verpackungstechnologie von Lebensmitteln üblichen oder zulässigen Stoffen wie Bindemitteln oder Farbstoffen. Aber auch andere, bevorzugt auf natürlichen Polymeren wie Cellulose oder dergleichen basierende Materialien oder Kunststoffe können eingesetzt werden.

25 Erfindungsgemäß geeignete HA-Stärkederivate sind solche, die mit einem Alkylenoxid wie Ethylenoxid oder Propylenoxid oder einem längerkettigen Alkylenoxid derivatisiert wurden. Die angelagerten Gruppen vergrößern die Abstände zwischen den Molekülketten und steigern damit deren Beweglichkeit. Der damit gegebene innere Weichmachungseffekt kann nur durch eine Zerstörung der chemischen Bindung rückgängig gemacht werden.
30

Das HA-Stärkederivat sollte auf der Trägerschicht vorzugsweise einen geschlossenen Film bilden. Sofern dies der Fall ist, können bereits sehr dünne Schichten ab etwa
35 6 g/m² Flächengewicht fettdicht sein, sofern das Trägermaterial eine relativ hohe Glätte aufweist.

Die Beschichtung kann als Oberflächenschicht der Innenseite der Verpackung und/oder als Zwischenschicht, ggf. auch mit der Funktion einer verklebenden Schicht
40 zwischen Papier oder Kartonagelagen oder dergleichen vorgesehen sein. Auch mehrere direkt aufeinander aufgebraachte Beschichtungen können vorteilhaft sein. Ebenso kann vor der Beschichtung mit dem HA-Stärkederivat ein sogenannter Vorstrich (z.B.

mit üblichen Papierbeschichtungsmitteln wie Kaolin oder Stärke) zur Anwendung kommen, der den Zweck einer Vorglättung der Oberfläche hat. Flächengewichte zum Erzielen einer fehlstellenfreien Schicht können so ggf. reduziert werden.

- 5 Die das HA-Stärkederivat enthaltende Schicht kann ggf. durch Aufbringen einer selbsttragenden Schicht aus diesem Material auf die Trägerschicht gelangen. Vorzugsweise wird jedoch eine Lösung oder Suspension des HA-Stärkederivats mit einer geeigneten Menge an Trockensubstanz erzeugt und auf dem Trägermaterial aufgetragen, vorzugsweise aus wässriger Lösung oder Suspension. Eine gut geeignete Menge an Trockensubstanz (TS) des HA-Stärkederivates liegt im Bereich von etwa 5 bis etwa 10 50 Gew.-%, bevorzugt im Bereich von etwa 10 bis etwa 40 Gew.-%, wobei die tatsächlich zu wählende Menge v o m vorgesehenen Auftragsverfahren abhängt. So kann in manchen Fällen eine Menge von bis hinunter zu 4 Gew.-% ausreichend sein.

- 15 Das Auftragen kann beispielsweise mit einem Raket, Sprühen oder per Walzenauftrag erfolgen, ebenso durch "Druckgießen" einer konzentrierteren Lösung sowie durch das flächige Aufbringen einer thermoplastifizierten Schmelze ("Extrusion"). In allen Fällen sollte der Wassergehalt des HA-Stärkederivates nach dem Aufbringen auf dem Trägermaterial vorzugsweise auf < 25 Gew.-% reduziert werden (z.B. durch Trocknen mit 20 IR oder konvektiv).

- Neben dem HA-Stärkederivat kann die auf der Trägerschicht aufzubringende Schicht auch weitere Additive enthalten. Zum einen bietet sich die Zugabe von Pigmenten (wie generell in der Papierindustrie üblich) an, andererseits die Zugabe von Glycerin, Harnstoff, Borax, Glyoxal oder anderen Zusatzstoffen mit ähnlichen Eigenschaften und Effekten, um gewünschte Werte bezüglich der Elastizität und der Wasser- und Langzeitstabilität zu erzielen. Auch die KIT-Zahl lässt sich in manchen Fällen durch Zusatz solcher Stoffe positiv beeinflussen, z.B. durch Zusatz von Glycerin oder Vernetzer (z.B. Glyoxal). Der Anteil an Hochamylose-Stärkederivat sollte vorzugsweise aber immer so 30 hoch sein, dass die Ausbildung eines fehlstellenfreien Films gewährleistet ist.

- Als Ausgangsmaterial wird vorzugsweise Kartoffelstärke mit einem Amylose Anteil von größer 70 % verwendet. Eine Kartoffelstärke mit einem Amyloseanteil von über 70 % kann beispielsweise aus genetisch modifizierten Kartoffelpflanzen isoliert werden, in 35 denen die enzymatische Aktivität der Stärkeverzweigungsenzyme SBE I und II gegenüber der nicht genetisch modifizierten Ausgangspflanze reduziert ist. Ein Verfahren zur Herstellung derartiger Pflanzen ist beispielhaft in Beispiel 1 beschrieben. Weitere Beschreibungen zur Herstellungen von gentechnisch modifizierten Kartoffelpflanzen mit einem Amyloseanteil von größer 70 % sind in den Patentanmeldungen WO 92/11375, 40 WO 97/20040, WO 92/14827, WO 95/26407 und WO 96/34968 und den Patenten US 5,856,467 US 6,169,226, US 6,469,231, US 6,215,042, US 6,570,066 und US 6,103,893 beschrieben.

Kartoffelpflanzen mit einer reduzierten enzymatischen Aktivität der Stärkeverzweigungsenzyme SBE I und SBE II können alternativ auch durch Selektion von geeigneten mutagenisierten Kartoffelpflanzen gewonnen werden.

5

Als Ausgangsmaterialien können auch Stärken mit einem Amyloseanteil von größer 70 % aus anderen Kulturpflanzen wie beispielsweise aus Mais, Weizen, Erbsen oder Tapioca eingesetzt werden. Pflanzen mit einem Amylose Gehalt von größer 70 % können durch genetische Modifikation unter Verwendung molekularbiologischer Methoden und/oder durch Züchtung und Selektion hergestellt werden.

10

Unter HA-Stärke wird eine Stärke mit einem Amylosegehalt von mindestens 70 % verstanden. Vorzugsweise liegt der Amylosegehalt bei mindestens 80 %, besonders bevorzugt bei mindestens 90 %.

15

Die chemische Modifizierung der Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von größer 70 % erfolgt beispielsweise mit einem C₂- oder C₃-Aklylenoxid. Propylenoxid ist bevorzugt.

20

Da die HA-Stärke in geeigneter Weise in Gegenwart von Base modifiziert wird, die für die Beschichtung vorgesehene Masse jedoch günstigerweise in etwa neutral reagieren sollte, so dass im Normalfall eine Neutralisierung mit Säure erfolgen muss, ist die modifizierte HA-Stärke in der Regel stark mit Salzen behaftet. Es ist von Vorteil, wenn dieser Salzgehalt nicht zu hoch ist. So empfiehlt es sich, dass die Beschichtungsmasse in der für den Auftrag vorgesehenen Konzentration eine Leitfähigkeit von nicht mehr als 4.000 - 5.000 pS/cm, vorzugsweise von < 2.000 pS/cm besitzt.

25

Die Zugabe von Säuren und Laugen sollte unter dem Gesichtspunkt erfolgen, dass das entstehende Salz lebensmittelrechtlich unbedenklich ist. Geeignete Säuren sind Phosphorsäuren, eine geeignete Base ist Natronlauge. Die Entsalzung kann beispielsweise durch Dialyse erfolgen.

30

Beschichtungen mit höher derivatisierter HA-Stärke zeigen günstigere KIT-Zahlen als solche mit geringeren Derivatisierungsgraden. Es ist aber nicht erforderlich, hohe Substitutionsgrade zu erreichen, denn bereits geringe Grade können zu positiven Effekten führen. Diese hängen aber auch von der Herkunft der eingesetzten HA-Stärke ab. Während ganz allgemein ein Derivatisierungsgrad von 0,05 bis 1,5 geeignet sein kann, sind Bereiche zwischen 0,1 bis 1,0, ganz besonders zwischen 0,1 und 0,3 bevorzugt.

35

Die Herstellung einer als Beschichtungsmasse oder Gießlösung für die vorliegende Erfindung geeigneten HA-Stärkeetherlösung kann beispielsweise wie folgt erfolgen: Die Stärke mit einem Amylosegehalt von größer 70 % (z.B. Weizen-, Mais-, Tapioka,

40

Kartoffel- oder HA-Erbsenstärke) wird in annähernd dem Doppelten ihres Gewichts an Wasser einige Stunden gerührt und anschließend grob vom Wasser befreit, z.B. durch Abnutschen. Sie nimmt dabei etwa ihr eigenes Gewicht an Wasser auf, so dass sie ungefähr 40 bis 60% Trockenmasse besitzt. Anschließend wird sie in etwa dem 1,5-fachen ihres Feuchtgewichts resuspendiert und durch Zugabe der gleichen Menge etwa 10%iger Base oder Lauge desintegriert. Sofort darauf werden innerhalb weniger Minuten bis ca. 1 Stunde etwa 25 - 75 Gew.-% Alkylendioxyd, vorzugsweise Propylenoxyd, bezogen auf das Ausgangsgewicht der trockenen HA-Stärke, zugeführt, wobei milde Temperaturen eingehalten werden sollten. Raumtemperatur ist gut geeignet.

Man lässt die Mischung mehrere Stunden rühren und anschließend etwa 20 Stunden ruhen; anschließend wird sie mit Säure neutralisiert. Soll eine Entsalzung erfolgen, geschieht dies z.B. durch Dialyse gegen Wasser. Die entsalzte Lösung wird ggf. schonend aufkonzentriert. Der Derivatisierungsgrad der HA-Stärke liegt bei Anwendung von etwa 50 Gew.-% Propylenoxyd bei etwa 0,2, in anderen Fällen entsprechend darüber oder darunter.

Eine Entsalzung oder Abtrennung störender Inhomogenitäten kann auch beispielsweise mittels Ultrafiltration erfolgen. Sollte das Produkt zu konzentriert sein, kann eine Verdünnung mit entionisiertem Wasser vorgenommen werden.

Nach Zusatz der möglicherweise gewünschten Additive (z.B. Konservierungsstoffe, Füllstoffe, Antistatika, Mittel zur Verbesserung der Elastizität, Vernetzungsmittel) kann bei Bedarf mittels Filter oder Zentrifuge eine mechanische Separation durchgeführt und dabei gleichzeitig eine Entgasung der zu verarbeitenden Lösung erreicht werden.

Eine für die Zwecke der Erfindung besonders geeignete Beschichtungslösung besitzt die folgenden rheologischen Eigenschaften:

Eine dynamische Viskosität von 0,1 Pas bis 40 Pas bei einer Temperatur von 25°C und einer Schergeschwindigkeit von 30,7 s⁻¹. Viskoelastische Eigenschaften der Polymerlösung, wobei das Verhältnis zwischen viskosem und elastischem Anteil $\tan \delta$ Werte zwischen 1 und 10 (max. 50) bei einer Temperatur von 25°C und einer Schergeschwindigkeit von 30,7 s⁻¹ annimmt. Mit dem beispielhaft genannten Verfahren lassen sich solche Werte ohne weiteres erhalten.

Das Verfahren bietet ferner den Vorteil, dass die HA-Stärke besonders schonend und insbesondere durchgängig bei relativ niedrigen Temperaturen (< 60°C) oder vollständig bei Raumtemperatur umgesetzt und verarbeitet wird, was positive Effekte für die Beschichtung des Trägermaterials bewirkt. Durch die Kaltwasserlöslichkeit nach der Neutralisation, Separation, Salzabtrennung und dem Aufkonzentrieren kann die Stärke mit einem Amylose Gehalt von 70 % derart schonend verarbeitet werden, dass keine oder nur unbedeutende Abbaureaktionen einsetzen.

Die wässrige Gießlösung kann vorzugsweise bei Raumtemperatur oder leicht erhöhten Temperaturen mit einem geeigneten Auftragssystem (z.B. Rakel) auf die zu beschichtende Materialbahn (Papier) aufgebracht werden.

5

Besonders günstig hat sich die Verwendung von nach dem Autoklav-Verfahren hergestellten Hydroxypropyletherstärken, insbesondere aus Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von größer 70 % erwiesen, die als Lösungen mit Trockensubstanz-Gehalten von 12 bis 20 Gew.-% und vorzugsweise mit Derivatisierungs-(DS-)Graden von 0,1 bis 1,0, stärker bevorzugt bis 0,4, eingesetzt werden. Diese zeigen im Vergleich mit Handelsmustern (mit Fluorcarbonsäuren beschichtet) deutlich bessere Fettdichtheiten, insbesondere auch in Knickstellenbereichen, die bei Faltschachtelanwendungen besonders kritisch sind. Im Vergleich zu den zuvor genannten erfindungsgemäßen Beschichtungen mit handelsüblichen Stärkederivaten können die für die Beschichtung mit diesen Stärken eingesetzten Flächengewichte reduziert werden.

10

15

Beispiel 1

Herstellung von transgenen Kartoffelpflanzen mit hohem Amylosegehalt

20 Kartoffelpflanzen mit einem Amylosegehalt von größer 70 % können hergestellt werden unter Verwendung der Antisense- oder der RNAi-Technologie mit dem Ziel die enzymatische Aktivität der Stärkeverzweigungsenzyme SBE I und SBE II zu reduzieren bzw. zu eliminieren.

25 Beispielsweise wurde die HA-Stärke produzierende transgene Kartoffellinie *Solanum tuberosum* AM99-2003 hergestellt in der die Aktivität der Stärkeverzweigungsenzyme inhibiert ist. Die genetische Transformation der Ausgangssorte *Dinamo* wurde durchgeführt mit einem Genkonstrukt, welches Genfragmente unter Kontrolle eines GBSS-Promoters von SBE I und SBE II in antisense-Orientierung enthält. PBluescript enthaltend ein 1620 Basenpaare langes Fragment des 3' Endes des SBE I Genes zwischen EcoRV und SpeI wird mit SpeI und XbaI geschnitten und ligiert mit einem 1243 Basenpaare SstI-XbaI Fragment des 3' Endes von SBE II. Der SBE I und der SBE 2 Komplex wird mit Hilfe von EcoRV und XbaI herausgeschnitten und in den mit SmaI und XbaI geöffneten Binärvektor pHo3.1 ligiert. Der entstandene Vektor wird mit pHabe12A bezeichnet, siehe Abbildung 1 und Nukleinsäuresequenz SEQ-ID No. 1.

30

35

PHo3.1 basiert auf pGPTVKan (Becker, D. et al., Plant Molecular Biology 20 (1992), 1195-1197) und enthält zusätzlich den 987 Basenpaare umfassenden GBSS-Promotor (siehe EP 0 563 189) der in die HindIII Stelle von pGPTVKan kloniert und dessen uidA Gen mit Hilfe von SmaI und SstI entfernt wurde.

40

Die Elternlinie *Dinamo* wird mit dem Konstrukt pHabe12A mit der in US 6,169,226 beschriebenen Methode transformiert und die transgenen Linien auf Kanamycin-haltigen

Medien selektioniert. Die Analyse des Amylosegehaltes der transgenen Pflanzen erfolgte nach der bei (Morrison, W.R. and Laignelet, B., J. Cereal. Sci. 1 (1983), 9-20) beschriebenen Methode.

- 5 Transgene Kartoffelpflanzen mit einem Amylosegehalt von mindestens 70 % wurden selektioniert und angebaut. Die hochamylosehaltige Stärke wurde nach herkömmlichen Methoden isoliert.

Beispiel 2

- 10 Hydroxypropylierung von hochamylosehaltiger Kartoffelstärke

15 Hochamylosehaltige Kartoffelstärke gewonnen aus genetisch modifizierten Kartoffelpflanzen - siehe Beispiel 1 - wurde im Labormaßstab hydroxypropyliert. Die Modifizierung der Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von 70 % erfolgte gemäß eines Autoklav- bzw. Homogenverfahrens.

- 20 Nach der Hydroxypropylierungsreaktion wurde die Lösung für die spätere Beschichtung von Karton durch Entsalzung und Aufkonzentrierung aufbereitet. Das Endprodukt sollte einen Derivatisierungsgrad von ca. 0,2, einen Trockengehalt (w/w) von ca. 18% sowie eine Leitfähigkeit von ca. 600 μ /cm aufweisen.

Im Rahmen der Versuche zur Kartonbeschichtung wurden mit der hydroxypropylierten HA-Stärke mittels Handrakelauftrag verschiedene Auftragsgewichte erzeugt.

- 25 Zur Beschichtung des Kartons (Firma Cupforma) wurde die HA-Stärke auf 40°C erwärmt. Die HA-Stärkelösung wurde (einmal bzw. zweimal) auf die gestrichene sowie ungestrichene Seite des Kartons aufgetragen.

Beispiel 3

- 30 Charakterisierung des Endproduktes

- 35 Ausgehend von 713 g HA-Stärke aus Kartoffelpflanzen mit einem Amylosegehalt von 70 % - hergestellt nach der in Beispiel 1 beschriebenen Methode - wurden 1770 g Hydroxypropyl-HA-Stärke mit einem Trockengewicht von 27 (w/w) % und einer Leitfähigkeit von 880 μ S/cm hergestellt. Die Leitfähigkeit konnte durch Diafiltration nicht weiter gesenkt werden.

Beispiel 4

Prüfung der Fettdichtigkeit anhand des 3M-KIT-Tests

- 5 Für die Überprüfung auf die Resistenz gegenüber nicht polaren Substanzen, wird die Beschichtung auf die Dichtigkeit gegenüber Gemischen mit 2 l Prüflösungen unterschiedlicher Konzentrationen an Rizinusöl, Toluol und n-Heptan getestet. Die KIT-Lösung mit der höchsten Zahl, die 15 Sekunden auf der Probe stand ohne einen Durchschlag bzw. eine Verfärbung zu bewirken, ist die kennzeichnende KIT-Zahl.

10

Es wurden Kartons der Firma Cupforma verwendet.

Die Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen.

Beschichtung in μm	Auftragsgewicht g/m^2	KIT-Test
12	52,7	>21
24	12,1	>21
24 x 2	44,6	>21

15

In allen drei Fällen erwies sich die Beschichtung mit einer KIT-Zahl > 21 als fettdicht gemäß KIT-Test nach 3M.

Beispiel 5

20

713 g Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von 70 % werden in 1,3 l destilliertem Wasser 4 Stunden lang gerührt und dann abgenutscht. Die feuchte Stärke wird mit 1,824 l Wasser aufgerührt und mit 1.811 g 10%iger Natronlauge, gewonnen durch Mischen von 376 g 50%iger NaOH mit 1.505 g Wasser versetzt. Die Derivatisierung erfolgt mit 323 g Proylenoxid bei 23°C, das innerhalb von 20 min unter Rühren zugesetzt wird. Man lässt die Mischung noch weitere 4 h rühren und 20 h ruhen. Neutralisiert wird mit 40%iger Phosphorsäure (ca. 700 g). Danach wird die Lösung in Dialyseschlauche gefüllt und ca. 4 Tage bei täglichem Wasserwechsel dialysiert. Das Produkt wird mit Hilfe eines Vacuum-Rotationsverdampfers auf über 20% Trockenmasse aufkonzentriert.

30

Der erhaltene HA-Stärkeether besitzt einen Derivatisierungsgrad von etwa 0,2. Die Leitfähigkeit der Beschichtungsmasse liegt bei etwa 1100 pS/cm.

- 35 Analog zu diesem Beispiel werden die nachstehenden Beschichtungsmassen hergestellt und mit einer 20 μm Rakel auf einseitig gestrichenen Chromo Duplexkarton (GD2), 310 g/m^2 , Dicke ca. 420 μm aufgetragen. Nach der Trocknung des ersten Auf-

11

trags (fingertrocken, ca. 2 h Dauer) wird eine zweite Schicht aufgetragen und bei Raumtemperatur und etwa 50% Raumfeuchte über etwa 1 Woche, ggf. auch länger, getrocknet.

- 5 An drei Kartonbögen der beschichteten Muster erfolgt die Bestimmung der Auftragsmasse durch Wägung (nach DIN 53 104: Prüfung von Papier und Pappe, Bestimmung des Flächengewichts, Sept. 1971) und der Dicke mit einem Dickenmessgerät (Taster: plan/ballig, 30 SKT, MB = 1 µm). Außerdem wird die KIT- Zahl für unpolare Substanzen nach dem 3M KIT-Test bestimmt. Dabei dienen Lösemittelgemische aus Rizinusöl,
- 10 Toluol und Heptan als Testflüssigkeiten. Die KIT-Lösung mit der höchsten Zahl, die 15 sec. auf der Probe steht, ohne einen Durchschlag oder eine Verfärbung zu bewirken, ist die kennzeichnende KIT-Zahl.

Verwendung von hydroxypropylierter hochamylosehaltiger Kartoffelstärke zur Erzielung hoher KIT-Zahlen

Zusammenfassung

5

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von fettdichtem Verpackungsmaterial mit einer KIT-Zahl von größer 21 durch Verwendung von hydroxypropylierter hochamylosehaltiger Kartoffelstärke.

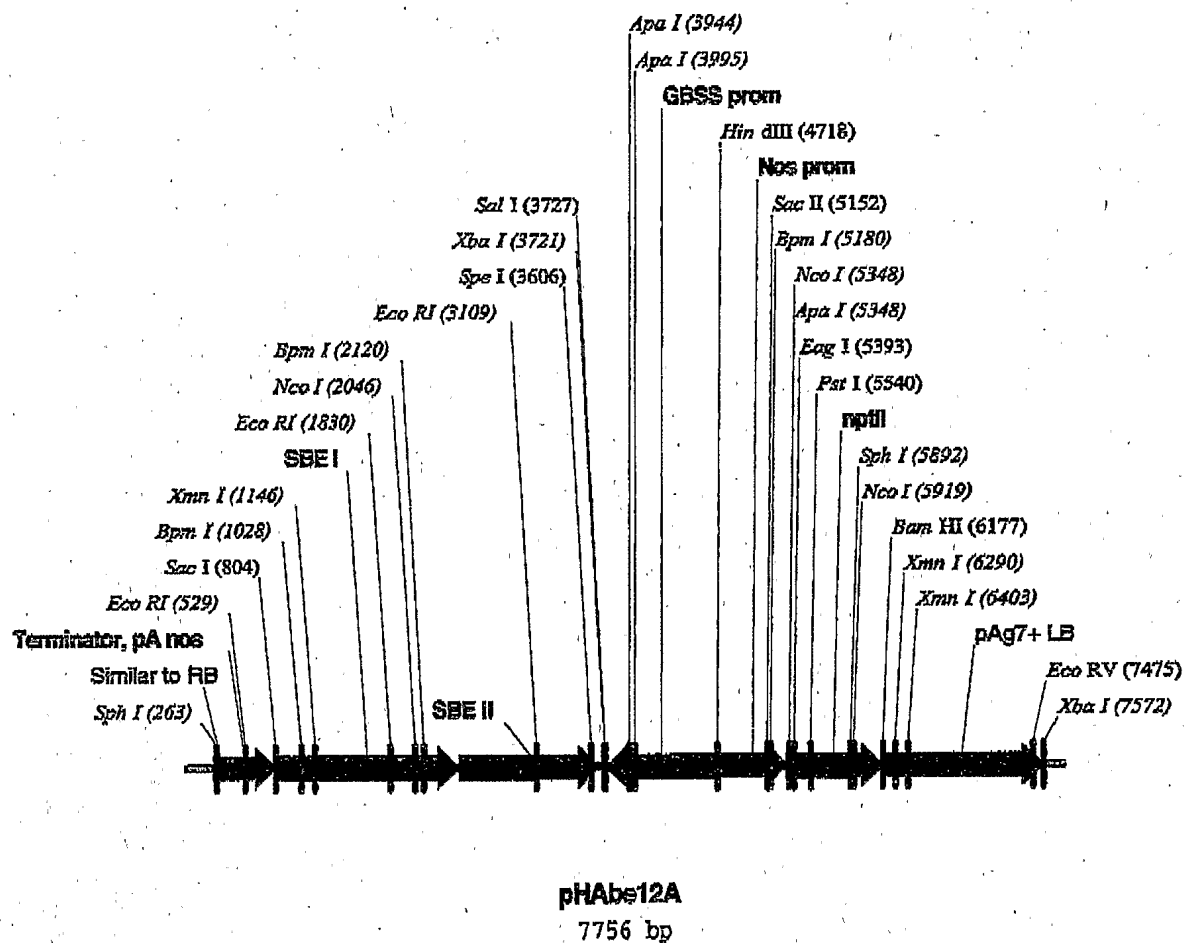
BASF Plant Science GmbH

20040256

PT 5045U DE



Figur 1



SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH

5 <120> Verwendung von hydroxypropylierter Kartoffelstärke zur
Erzielung hoher KIT-Zahlen

<130> AE20040256

10 <140> AE20040256

<141> 2004-03-31

<160> 1

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 15294

<212> DNA

20 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Vektor
pHabel2A

25

<400> 1

30

35

40

45

50

55

60

ggcgggagg	gttcgagaag	ggggggcacc	cccttcggc	gtgcggggc	acgcgcacag	60
gggcagccc	tggttaaaaa	caaggtttat	aaatattggt	ttaaaagcag	gttanaagac	120
aggttagcgg	tgccgaaaaa	acgggcccga	acccttgcaa	atgctggatt	ttctgcctgt	180
ggacagcccc	tcaaatgtca	ataggtgcgc	ccctcatctg	tcagcaactct	gcccctcaag	240
tgtcaaggat	cgcgcccctc	atctgtcagt	agtcggcgcc	ctcaagtgtc	aatacgcag	300
ggcacttate	cccagggttg	tccacatcat	ctgtgggaaa	ctcgcgtaaa	atcaggcggt	360
ttcgcgatt	tgcgaggctg	gccagctcca	cgtcggcgcc	cgaaatcgag	cctgcccctc	420
atctgtcaac	gccggcgccg	gtgagtcggc	ccctcaagtg	tcaacgtccg	ccctcatct	480
gtcagtgagg	gccaaagttt	cgcgaggtta	tccacaacgc	gggcggccgc	ggtgtctcgc	540
acacgggttc	gacggggttt	ctggcgcggt	tgcaggggcca	tagacggccg	ccagcccagc	600
ggcgagggga	accagocogg	tgagcgctgc	aaaggcgctc	ggttttgct	tgctcgtcgg	660
tgatgtactt	cacoagctcc	gcgaagtgcg	tcttcttgat	ggagcgcatg	gggacgtgct	720
tggaatcac	gggcaccccc	cgcccggttt	agcggtctaa	aaagtoatgg	ctctgcccctc	780
gggcggacca	cgcccatcat	gaccttgcca	agctcgtcct	gcttctcttc	gatcttcggc	840
agcagggcga	ggatcgtggc	atcacccgaac	cgcgcgctgc	gcccgtcgtc	ggtgagccag	900
agtttcagca	ggccgcccag	gcccggccag	tcggccattga	tgcgggcccag	ctcgcgggac	960
tgctcatatg	ccacgacgcc	cgtgattttg	tagccctggc	cgacggccag	caggtaggcc	1020
gacaggctca	tgccggcgcc	cgcgcgtttt	tcttcaatcg	ctcttcgttc	gtctggaagg	1080
cagtacacct	tgataggtgg	gctgcccctc	ctgggttggt	tggtttctac	agccatccgc	1140
ttgcccctcat	ctgttacgcc	ggcggttagcc	ggccagcctc	gcagagcagg	attcccgttg	1200
agcaccgcca	ggtgcgaata	agggacagtg	aagaagggaac	acccgctcgc	gggtgggct	1260
acttcacctc	tctgcccggg	ctgacgcccgt	tggtatacacc	aaggaaagtc	tacacgaacc	1320
ctttggcaaa	atcctgtata	tctgcccga	aaggatggat	ataccgaaaa	aatcgctata	1380
atgaccccga	agcaggggta	tgcagcgga	aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	1440
ggacaggtat	ccggtaaagc	gcaggggtcg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	1500
gggaaacgcc	tggtatcttt	atagtcctgt	cgggtttcgc	caoctctgac	ttgagcgctc	1560
atctttgtga	tgctcgtcag	ggggggcgag	cctatggaaa	aacgccagca	acggggcctt	1620
tttacgggtc	ctggcctttt	gctggccttt	tgctcacatg	ttctttctctg	cgttatccc	1680
tgattctgtg	gataacgta	ttacgcctt	tgagtgaagt	gataccgctc	ggcgagccg	1740
aacgacggag	cgcagcgagt	cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgccaga	aggccggcag	1800
agaggccgag	cgcggccgtg	aggcttggac	gctagggcag	ggcatgaaaa	agcccgtagc	1860
gggctgctac	ggcggtctga	cgcggtggaa	agggggaggg	gatgttgtct	acatggctct	1920
gctgtagtga	gtgggttgcg	ctccgggaag	ggtcctgac	aatcgtcacc	ctttctcgtg	1980
cottcaaoct	tctgacaac	gagcctcctt	ttcgccaatc	catcgacaat	caccgcgagt	2040
ccctgctoga	acgtctgcgtc	cggacgggct	tcgtcgaagg	cgtctatcgc	ggcccgcaac	2100
agcggcgaga	gcggagcctg	ttcaacgggtg	cgcggcgct	cgccggcatc	gctgtcgcg	2160
gocctgctcot	caagcacggc	cccaacagtg	aagtagctga	ttgtcatcag	cgcattgacg	2220
gcgtcccccg	ccgaaaaaac	cgcctcgcag	aggaagcgaa	gctgcgcgtc	ggcggtttcc	2280

2

	atctgcccgtg	cgcccccgtcg	ogtgcggcgca	tggatgcgcg	cgccatcgcg	gtaggcgagc	2340
	agcgccctgcc	tgaagctgcg	ggcattcccg	atcagaaatg	agcgccagtc	gtcgtcggtc	2400
	ctcgccacccg	aatgcgtatg	attctccgcc	agcatgggtt	ogggccagtc	gtcgcagcgc	2460
5	gcccgccttgt	tcctgaagtg	ccagtaaagc	gcgggtgctt	gaacccccaa	ccgttccgcc	2520
	agtttgccgtg	tcgtcagacc	gtctacggcg	acctcggtca	acaggtccag	ggcgccacgg	2580
	atcactgtat	tcggctgcaa	ctttgtcatg	cttgacactt	tatcactgat	aaacataata	2640
	tgtccaccaa	cttatcagtg	ataaagaatc	cgcgcggttc	atcggaccag	cggaggctgg	2700
	tcgggaggcc	agacgtgaaa	cccaacatac	ccctgatcgt	aattctgagc	actgtcgcgc	2760
	tcgacgctgt	cggcatcggo	ctgattatgc	cgggtgctgc	gggcoctctg	cgcgatctgg	2820
10	ttcactcgaa	cgaagtcacc	gcccactatg	gcattctgct	ggcgctgtat	gcgttggtgc	2880
	aattttgocct	ogccactgtg	ctggggcgcg	tgtcggatcg	tttcgggggg	cgcccaatct	2940
	tgtcgtctct	gctggccggc	gccaagatct	ggggaaaccc	gtggttggga	tgccacatac	3000
	aatggacgaa	cggataaacc	ttttcagccc	cttttaataa	tccgattatt	ctaataaacg	3060
	ctcttttctc	ttaggtttac	ccgcgaatat	atcctgtcaa	acactgatag	tttaaaactg	3120
15	aggogggaaa	cgacaatctg	atcatgagcg	gagaattaag	ggagtcacgt	tatgaccccc	3180
	gocgatgacg	cgggacaaag	cgttttacgt	ttggaaactg	cagaacccga	acgttgaaag	3240
	agccactcag	cggatctgaa	ttcccgatct	agtaacatag	atgacaccgc	gcgcgataat	3300
	ttatcctagt	ttgcgcgcta	tattttgttt	tctatcgctt	attaaatgta	taattgcccc	3360
	actotaatca	taaaaaccca	tctcataaat	aacgtcatgc	attacatggt	aattattaca	3420
20	tgtttaacgt	aattcaacag	aaatttatat	ataatcatcg	caagaccggc	aacaggatct	3480
	aattottaaga	aacttttatt	ccaaatgttt	gaacgatcgg	ggaaattcga	gctcggtaac	3540
	atcatgtttac	aaaacttttt	gctgtgagca	gtagatatgg	aaacccggag	gacctaaagt	3600
	atctgataga	taaagcacat	agcttgggtt	tacaggtttt	ggtggatgta	gttcacagtc	3660
25	atgcaagcaa	taatgccact	gatggccctc	atggctttga	tattggccaa	ggtttotcaag	3720
	aatocacttt	tcagtctgga	gagcaagggt	accataagtt	gtgggatagc	aggctgttca	3780
	actatgccaa	ttggggaggt	cttcgtttcc	ttctttccaa	cttgaggtgg	tggctagaag	3840
	agtataactt	tgaaggattt	cgttttgatg	gaataaottc	tatgtctgat	gttcacatct	3900
	gaatcaatat	gggatttaca	ggaaactata	atgagtattt	cagcgaggct	acagatgttg	3960
	atgctgtggt	ctatttaatg	ttggccaata	atctgattca	caagattttc	ccagacgcaa	4020
30	ctgtttattg	cgaagatgtt	tctggtatgc	ogggcccttg	ccggccctgt	tctgagggag	4080
	gaattgggtt	tgattacggc	ctggcaatgg	caatcccaga	taagtggata	gattatttaa	4140
	agaataaaaa	tgatgaagat	tggtccatga	aggaagtaac	atcgagtttg	acaaatagga	4200
	gatatacaga	gaagtgtata	gcataatggc	agagccatga	tcagtctatt	gtcgggtgac	4260
35	agaccatttg	atttctctca	atggacaaag	agatgtatcc	tggcatgtct	tgcttgacag	4320
	atgcttctcc	tgttattgat	cggagaaatt	cgcttcacaa	gatgatccat	tttttcacaa	4380
	tggcccttggg	aggagagggg	tacctcaatt	tcattgggtta	cgagtttggc	catcctgagt	4440
	ggattgactt	ccctagagag	ggcaataatt	ggtgttatga	caaatgtaga	cgcocagtgga	4500
	accttgccga	tagcgaacac	ttgagataca	agtttatgaa	tgcatttgat	agagctatga	4560
40	attcgcctga	tgaaaagttc	tcattcctcg	catcaggaaa	acagatagta	agcagcatgg	4620
	atgatgagaa	gaaggttggt	gtgtttgaac	gtggtgacct	ggtatttgta	ttccaacttc	4680
	accacaataa	cacatacgaa	gggtataaag	ttggatgtga	cttgccaggg	aagtacagag	4740
	ttgcactgga	cagtgtatgt	tgggaatttg	gtggccatgg	aagagctggt	catgatgttg	4800
	accatttcac	atcacacgaa	ggaatacctg	gagttccaga	aacaaatttc	aatggctcgt	4860
	caaattccct	caaagtgtgt	tctcctgcgc	gaacatgtgt	ggcttattac	agagttgacg	4920
45	aacgcctgtc	agaaaotgaa	gtttaccaga	cagacatttc	tagtgagcta	ctaccaacag	4980
	ccaatatcga	ggagagtgc	gagaaaactta	aagattcgtt	atctacaaat	atcagtaacg	5040
	ttgacgaact	catgtcagaa	actgaagttt	accagacaga	catttctagt	gagctactac	5100
	caacagccag	tatcgaggag	agtgcagaga	aacttaaaag	ttcattatct	acaaatatca	5160
	gtacgtggtt	atcattggat	gtgggattcc	ogootcttta	attatggaaa	ctgggaggtta	5220
50	cttaggtatc	ttctotocaaa	tgcgagatgg	tgggttgatg	agttcaaat	tgaatggatt	5280
	agattcagtg	gtgtgacatc	aataatgtat	actcaccacg	gattatoggt	gggattccact	5340
	gggaactaca	aggaaactct	tggactcgca	actgatgtgg	atgctgttgt	gtatctgatg	5400
	ctggtcaacg	atcttattca	tgggcttttc	cagatgcaat	taccatttgt	gaagatgtta	5460
	gcggaaatgcc	gacattttgt	attcccgctc	aagatggggg	tgttggtctt	gactatcggc	5520
55	tgcataatggc	aattgctgat	aaatggattg	agttgctcaa	gaaacgggat	gaggattgga	5580
	gagtgggtga	tattgttcat	acactgacaa	atagaaagtg	gtcggaaaag	tgtgtttcat	5640
	acgctgaaaag	tcatgatcaa	gctctagtgc	gtgataaaac	tatagcattc	tggctgatgg	5700
	acaaggatat	gtatgatatt	atggctctgg	atagaocata	aacatcatta	atagatcgtg	5760
	ggatagcatt	gcacaagatg	attaggcttg	taactatggg	attaggagga	gaaggggtacc	5820
60	taaattttcat	gggaaatgaa	ttcggccacc	ctgagtggat	tgatttcctt	agggctgaac	5880
	aacacotctc	tgatggctca	gtaattcccg	gaaaccaatt	cagttatgat	aaatgcagac	5940
	ggagatttga	cctgggagat	gcagaatatt	taagataccg	tgggttgcaa	gaatttgacc	6000
	gggcatatgca	gtatottgaa	gataaatatg	agtttatgac	ttcagaacac	cagttcatat	6060
	cacgaaagga	tgaaggagat	aggatgattg	tatttgaaaa	aggaaaccta	gtttttgtct	6120

	tttaatttttca	ctggacaaaa	agctatttcag	actatcgcat	aggctgcctg	aagcctggaa	6180
	aatacaaggt	tgccttcggac	tcagatgatc	cacttttttgg	tggcttcggg	agaattgatc	6240
	ataatgcoga	atatttcacc	tttgaaggat	ggtatgatga	togtctcgt	tcaattatgg	6300
5	tgatgcacc	tagtagaaca	gcagtgggtct	atgcactagt	agacaaagaa	gaegaagaag	6360
	aagaagaagt	agcagtagta	gaagaagtag	tagtagaaga	agaatgaacg	aacttgtgat	6420
	cgogttgaaa	gatttgaagg	ctacatagct	ctagagtoga	cctgcatgaa	atcagaaata	6480
	attggaggag	atgagtaaaa	gttaccactt	gttgagctgt	gtgagtgaat	gagtggagaat	6540
	gaggaggtgc	ctgccttatt	tgtagcaggt	ttcagtgaca	cgtgtcaaga	gaatagcggg	6600
	tggctatccc	ttagcagaag	gcaactgttg	acactgtatt	atagggaat	gotcatcgac	6660
10	agtattatgg	gocctctctt	tgttgattca	cggtcggaat	toaacttggg	ccttgcaatg	6720
	ggcccgctcg	gttctgtctc	ctagtatcta	aaaaactaaa	ccaactccot	cctaccgcta	6780
	ccacttgaca	ttcctatgtc	tcgtgttaat	taaattatta	ttatagtaat	taaaaaataat	6840
	atctaggtac	tggtagtgg	ccctccctcc	actagaatat	tagttacttc	ccccttagct	6900
	ttgtattcca	aattactgta	aatatatttt	ctaatttttt	acgacaaaca	agatctaatt	6960
15	atgaatgcac	aattctaaag	gttgaatata	ttactttact	tggtttagcc	tatattaagt	7020
	tgcatttttag	tattaagatt	gagatgcatg	gttctattac	aaaattgata	cactgtctaa	7080
	ggaaggatgg	ttaaaaacaa	cattcaatgt	ttgttacatt	tottcctatt	gtattttttt	7140
	tttaacgagc	ttcccgata	catcataaca	tgtctccgtt	ccacttggca	ggaaaaaaaa	7200
20	ataccacaaac	aggaagatac	tgtcaagtat	atccatagat	gaggacttaa	tggataggct	7260
	tttcgaggat	tcataaatca	taatatctgg	cggaggagtc	aattaaatca	ttgtggtttg	7320
	tatcttgatt	actccgtcaa	cagccaaata	gaaaagtttg	aaaagagaga	aaggattttg	7380
	tacaagatac	tgttcgattt	gttaagtaat	gaacaaaaacg	gagtaacata	attttctatc	7440
	tcgttaaagc	ttcacgctgc	cgcaagcact	cagggcgcaa	gggctgctaa	ggaagcggaa	7500
25	cacgtagaaa	gccagtcggc	agaaaacggg	ctgaccccg	atgaatgtca	gctactgggc	7560
	tatctggaca	agggaaaaacg	caagcgcaaa	gagaaagcag	gtagcttgca	gtgggcttac	7620
	atggcgatag	ctagactggg	cggttttatg	gacagcaagc	gaaccgggat	tgcagctgg	7680
	ggcgccctct	ggtaaaggtg	ggaagccctg	caaagttaac	tggatggctt	tcctgcggcc	7740
	aaggatctga	tggcgacggg	gatcaagatc	atgagcggag	aattaaggga	gtcacgttat	7800
	gaccccccgc	gatgaacggg	gacaagccgt	tttacgtttg	gaactgacag	aaccgcaacg	7860
30	ttgaaggagc	cactcagccg	cggttttctg	gagtttaatg	agctaagcac	atacgtcaga	7920
	aaccattatt	gcgcgttcaa	aagtgcgcta	aggtcactat	cagctagcaa	atatttcttg	7980
	tcaaaaaatgc	tcactgacg	ttccataaat	tccctcgggt	atocaattag	agttctatat	8040
	tcactctcaa	tcagatctc	gactctagtc	gagggcccat	gggagcttgg	attgaacaag	8100
35	atggattgca	cgcaagttct	ccggccgctt	gggtggagag	gctattcggc	tatgactggg	8160
	caacaacagac	aatcggtg	tctgatgccc	cogtgtccg	gctgtcagcg	caggggcgcc	8220
	cggttctttt	tgtcaagacc	gacctgtccg	gtgcctgaa	tgaactgcag	gacgagggcag	8280
	cgccgctatc	gtggctggcc	acgaacggcg	ttccttgccg	agctgtgctc	gacgtgtgca	8340
	ctgaagcggg	aagggaactgg	ctgctattgg	cggaagtgcc	ggggcaggat	ctcctgtcat	8400
40	ctcactctgc	tcctgcggag	aaagtatcca	tcattggctga	tgaactgcgg	cggtgtgata	8460
	cgcttgatcc	ggctacctgc	ccattcgacc	accaagcgaa	acatcgcatc	gagcggagcag	8520
	gtactcggat	ggaagccggg	cttgtcgatc	aggatgatct	ggacgaagag	catcaggggc	8580
	tcgcgcacgc	cgaactgttc	gccagggtca	aggcgcgcac	gcccagacggc	gaggatctcg	8640
	togtgaccaca	tggcgatgcc	tgtttgcoga	atatcatggg	ggaaaatggc	cgctttcttg	8700
45	gattcatcga	ctgtggccgg	ctgggtgtgg	cggacgcgta	tcaggacata	cggttggcta	8760
	ccogtgatat	tgcgtgaagag	cttggccggc	aatgggctga	cogcttctct	gtgctttacg	8820
	gtatcgccgc	tcocgattog	cagcgcacog	ccttctatcg	ccttcttgac	gagttcttct	8880
	gagcgggacc	caagctagct	tgcacggatc	ccccgatgag	ctaagctagc	tatatcatca	8940
	atttatgtat	tacacataat	atcgcaactca	gtctttcatc	tacggcaatg	taccagctga	9000
50	tataatcagt	tattgaaata	tttctgaatt	taaaacttgc	toaataaatt	tatgtttttg	9060
	ottggactat	aataacctgac	ttgttatttt	atcaataaat	atttaaaacta	tattttctttc	9120
	aagatgggaa	tttaattcaat	ggcogtogg	ttacaacgtc	gtgactggga	aaaccctggc	9180
	gttaccacaac	ttaatogcot	tgcagcacat	ccccctttcg	ccagctggcg	taatagcgaa	9240
	gaggcccgca	ccgatcgccc	ttcccaacag	ttgcgcagcc	tgaatggcgc	ccgctccttt	9300
	cgctttcttc	ccttcccttt	tgcgcacgtt	cccggtttt	ccccgtcaag	ctctaactcg	9360
55	ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	ctcgacccca	aaaaaactga	9420
	tttgggtgat	ggttcacgta	gtggggcact	gccttgatag	acgggttttt	gccttttgac	9480
	gttggagtc	aogttcttta	atagtggaat	cttgttccaa	actggaaaca	cactcaaccc	9540
	tatctcgggc	tattcttttg	atttataagg	gattttgocg	atttcggaac	cacctcaaaa	9600
	caggattttc	gcctgctggg	gcaaacacgc	gtggaccgct	tgttgcaact	ctctcagggc	9660
60	caggcgggtga	agggcaatca	gtcttgccc	gtctcactgg	tgaaaagaaa	aaccacccca	9720
	gtacattaaa	aacgtccgca	atgtgttatt	aagttgtcta	agcgtcaatt	tgtttacacc	9780
	acaatatata	ctgcacacag	ccagccaaca	gtcctccgac	cggcagctcg	gcacaaaatc	9840
	accactcgat	acaggcagcc	catcagtcog	ggaoggcgtc	agcgggagag	ccgttgttaag	9900
	gcgccagact	ttgctcatgt	taccgatgct	attcgggaaga	acggcaacta	agctgcgggg	9960

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

```
tttgaacac ggatgatctc ggggagggtt gcatgttgat tgtaacgatg acagagcgtt 10020
gctgcctgtg atcaaatatc atctccctcg cagagatccg aattatcagc cttottatto 10080
attctctcgt taaccgtgac aggcgtgtcg tcttgagaac tatgcccaga taataggaaa 10140
tcgcttgata aagcgcgtga ggaagctgag tggcgcgtatt tctttagaag tgaacgttga 10200
cgatatcaac tccctatcc attgctcacc gaatggtaca ggtcggggac ccgaagttcc 10260
gactgtcggc ctgatgcac cccggctgat cgaccccgaga totagatctg gggctgagaa 10320
agcccagtaa ggaacaact gtaggttcga gtoccgagat ccccggaac caaagggaag 10380
aggttaaacc cgtccgatc aggcggagcc acgocaggcc gagaacattg gttcctgtag 10440
gcatcgggat tggcggatca aacactaaag ctactggaac gagcagaagt cctccggccg 10500
ccagttgcca ggcggttaaag gtgagcagag gcacggggagg ttgcoacttg cgggtcagca 10560
cgggttcgaa cgcocatgaa accgcccccg ccaggcccg cggacgccc agttccgcaa 10620
gcgctgcgtt tgggtgtcaac accaacagcg ccacgcccgc agttccgcaa atagccccc 10680
ggacccgat caatcgtatc gggctaccta gcagagcggc agagatgaac accgacatca 10740
gcggtctgac agcgcctacc gtcgcgcgca ccccgcccg caggcggtag accgaaataa 10800
acaacaagt ccagaatagc gaaatattaa gtgcgcgag gatgaagatg cgcattccac 10860
agattcccg tggaaatctgt cggacagcaa tcacgagcaa taaacccgc cgaacggccc 10920
gcagcagcat accggcgacc cctcggcctc gctgttcggg ctccacgaaa acgcccga 10980
gatgcgcctt gtgagcgtcc ttggggccgt cctcctgttt gaagaccgac agcccaatga 11040
tctcgcctc gatgtaggcg ccgaatgcc cggcatctog caaccgttca gcgaacgcct 11100
ccatgggctt tttctcctcg tgcctgtaaa cggacccgaa catctctgga gctttcttca 11160
gggcccgaac tccgatctcg cggaaatcct gcacgtccgc cgtcccaagc cgtccaatct 11220
gagccttaac cacaattgtc aatttttaac ctctgtttat cggcagttcg tagagcgcgc 11280
cgtgcgtccc gagcgatact gagcgaagca agtgcgtoga gcagtgccc cttgttctcg 11340
aaatgccagt aaagcgcgtg ctgctgaacc ccagcccgga actgacccca caaggcccta 11400
gcgtttgcaa tgcacaggt catcattgac ccaggcgtgt tccaccaggc cgtgcctcg 11460
caactcttgg caggcttcgc cgactcgtc gcgccacttc ttcacgcccg tggaaatccga 11520
tcgcgcacat aggcggaagg tttccagctt gagcgggtac ggtcccggg ggcagctgaa 11580
atagtcgaac atcgcgtcgg ccgtcggcga cagcttgagg tacttctccc atatgaattt 11640
cgtgtagtgg tcgccagcaa acagcacgac gatttctcct tcgatcagga cctggcaacg 11700
ggacgttttc ttgocacggg ccaggacgcg gaagcgggtg agcagcgaca ccgattccag 11760
gtgcccacag cggtcgggac tgaagcccat cgcctgcgc tgtaggcgcg acaggcattc 11820
ctcggccctc gtgtaatcgc ggcattgat ccagcagccc aggtcctggc aaagctgta 11880
gaacgtgaag gtgatcggc cgcgatagg ggtgcgcttc gcgtactcca acacctgtg 11940
ccacaccagt tcgtcatcgt cggcccgag ctgcagcgcg gtgtagggtg tcttcacgtc 12000
cttgttgacg tggaaaatga cctgtttttg cagcgcctcg cgcgggattt tcttgttgog 12060
cgtggtgaac agggcagagc gggccgtgtc gtttggcctc gctggcatcg tgtccggcoa 12120
cggogcaata tcgaacaagg aaagctgcac ttccttgatc tgctgcttcg tgtgtttcag 12180
caacgcggcc tgcctggcct cgtgcacgt ttttgcagg toctgcggg cgttttttcg 12240
cttcttggtc gtoatagttc ctgcgtgtc gatggtcatc gacttcgcca aacctgcgc 12300
ctcctgttgg agacgacgcg aacgctccac ggcggccgat ggcgcgggca gggcaggggg 12360
agccagttgc acgctgtcgc gctcgatctt ggcctgagct ggcgtgcgg cttgcgatgg tttcggcctc 12420
ggactggaag gtttcggggg cgacagcgt cgtcctgtat ttgcctcggt gacttcgggt gcocttattc 12540
ctcggcgtaa aaccccggt gcattcagtt ggcacgccc cagataatcc accctatcgg caatgaagtc 12600
attcattcac cctccttgcg ccttggtgtc cgtccttctc gtacttggtt ttccgaatct tgccctgcac 12660
ctgatttgac ccgcctgggt ccttggtgtc cgtccttctc gtacttggtt ttccgaatct tgccctgcac 12720
ggtcccgtag accgtctggc cgtccttctc ccaataactt gccgtgggccc tgggocgtgag agccaaaaca 12780
gaataccagc gacccttgc aagaagtcgg tggcctcctg cttgttcgog gcacgtgtgc gccacatcta 12840
ggtactaaaa caattcatcc agtaaaatat aatattttat tttctcccaa toaggcttga 12900
tcccagtaa gtcaaaaaat agctogacat actgttcttc ccgatatacc tccctgatcg 12960
acoggacgca gaaggcaatg tcataccact tgcctgccct gccgttctc ccaagatcaa 13020
taaagccact tactttgcca tctttcaca aatattttat tcttcaaaaa atcatacagc tcgcccggat 13140
aaaagacaag tttctcttgg agtgcttctc tcccagtttt cgcaatccac atcggccaga tcgttattca 13200
gttaagtaac caattcggct aagcggctgt ctaagctatt cgtataggga caatccgata 13260
tgtcgatgga gtgaagagc ctgatgcact ccgcatacag ctogataatc ttttcagggc 13320
tttgttcate ttcatactct tccgagcaaa ggacgccatc ggootcactc atgagcagat 13380
tgcctccagc atcatgocgt tcaaaagtga ggcactttgg aacaggcagc tttccttcca 13440
gccatagcat catgtccttt tcccgttcca catcataagg ggtcccttta taccggctgt 13500
ccgtocattt taatatagg ttttoatttt cttccaccag cttatatacc ttagcaggag 13560
acattccttc cgtatctttt acgcagcggt attttctgat cagttttttc aattccgggt 13620
atattctcat ttttagcatt tattatttcc ttctcttttt ctacagtatt baaagatacc 13680
ccaagaagct aattataaca agaagaaatc caattcactg ttcttgcatt tctaaaacct 13740
taaataccag aaaacagctt tttcaaagtt gttttcaaag ttggcgatata acatagttatc 13800
```

5
10
15
20
25

gacggagccg	atcttgaaac	cacaattatg	ggtgatgctg	ccaacttact	gatttagtgt	13860
atgatgggtg	ttttgaggtg	ctocagtgge	ttctgtgtct	atcagctgtc	cctcctgttc	13920
agotactgac	ggggtggtgc	gtaacggcaa	aagcaccgcc	ggacatcage	gctatctctg	13980
ctctcactgc	cgtaaaacat	ggcaactgca	gttcacttac	acogcttctc	aaccgggtac	14040
gcaccagaaa	atcattgata	tggccatgaa	tggcggttga	tgccggggcaa	cagcccgcat	14100
tatgggcgtt	ggcctcaaca	cgattttacg	tcacttaaaa	aactcaggcc	gcagtcggta	14160
aoctcgcgca	tacagccggg	cagtgcagtc	atcgtctgcg	cggaaatgga	cgaacagtg	14220
ggotatgtcg	gggctaaatc	gcgccagcgc	tggctgtttt	acgcgtatga	cagtctccgg	14280
aagacgggtg	ttgcgcacgt	attcggtgaa	cgcactatgg	cgacgctggg	gcgtcttatg	14340
agcctgctgt	caccttttga	cgtggtgata	tggatgacgg	atggctggcc	gctgtatgaa	14400
tcocgcctga	agggaaaagct	gcacgtaatc	agcaagcgat	atacgcagcg	aattgagcgg	14460
cataacctga	atctgaggca	gcacctggca	cggctggggac	ggaagtcgct	gtcgtttotca	14520
aaatcgggtg	agctgcatga	caaagtcatc	gggcattatc	tgaacataaa	acactatcaa	14580
taagttggag	tcattaccca	attatgatag	aatttacaa	ctataaggtt	attgtcctgg	14640
gtttcaagca	ttagtccatg	caagttttta	tgctttgccc	attctataga	tatattgata	14700
agcgcgctgc	ctatgccttg	ccccctgaaa	tccttacata	cggcgatata	tcctatatata	14760
aagatatatt	atcttatcag	tattgtcaat	atattcaagg	caatctgcoct	cctcatcctc	14820
ttcatctctc	tcgtcttgg	agctttttta	atatggcgct	tcatagagta	attctgtaaa	14880
ggtccaatc	tcgttttcat	acctcgggtat	aatcttaoct	atcacctcaa	atggttcgct	14940
gggttttatcg	cacccccgaa	cacgagcacg	gcaccccgca	ccactatgcc	aagaatgccc	15000
aaggtaaaaa	ttgccggccc	cgcacatgaag	tcogtgaatg	ccccgacggc	ogaagtgaag	15060
ggcaggccgc	caccagggcc	gcgcgcctca	ctgcccggca	cctggctcgt	gaatgtcgat	15120
gccagcacct	gcggcacgtc	aatgcttccg	ggcgtcgcg	tcgggctgat	cgcccatccc	15180
gttactgccc	cgatcccgcc	aatggcaagg	actgccagcg	ctgcccatttt	tgggggtgagg	15240
cogttcgcgg	ccgaggggcg	cagcccctgg	gggatggga	ggcccgcggt	agcg	15294